

Újabban világossá vált, hogy a Progesterone-induced blocking factor (PIBF) amely a progesteron számos immunológiai hatását közvetíti, nem csupán a lymphocytákban és terhességgel asszociált szövetekben, de számos differenciálatlan gyorsan növekedő sejtben és rosszindulatú daganatokban is jelen van. A teljes hosszúságú PIBF, a sejtosztódásban szerepet játszó pericenteoláris szatellit részeként azonosították, így elképzelhető, hogy a terhesség fenntartásában játszott szerepén felül ez a molekula a daganatok létrejöttét és progresszióját is befolyásolhatja.

Az Oxidatív stressz hatása a PIBF receptor alegységek összeszerelődésére.

A kutatás célja annak vizsgálata volt, hogy membrán lipid szerveződésben az oxidatív stressz hatására a létrejövő változások hogyan befolyásolják a PIBF receptorának funkcióját.

A lymphocyta populáció membránfluiditásának oxidatív stressz hatására bekövetkező változását electron paramagnetikus rezonancia (EPR), míg az egyedi sejteken bekövetkező változásokat két-foton mikroszkópia segítségével követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy az oxidatív stressznek kitett sejteken a kezelés időtartamával, ill. a hőmérséklet növekedésével arányosan csökken a membrán fluiditása; megnövekszik a rigid domaineknek megfelelő gél fázisú (GP) lipid raft területek száma. Megfigyelhető továbbá a lipid raftok számának növekedése, mely a H₂O₂ koncentrációjával arányos.

A PIBF receptor kötését normális és stressz körülmények között, AlexaFluor647/PIBF és Laurdan kettősen jelölt sejteken, konfokális- és két-foton mikroszkópiával vizsgáltuk.

A PIBF kötődést követően, a lymphocyták felszínén feldúsultak a rigid régiókat jellemző magas GP területek. A PIBF receptorkötése után a plazma membrán rigidebbé válik, és megnövekszik a lipid raft domainek mérete, míg számuk csökken.

Az oxidatív stressznek kitett sejteken ezek a változások nem következnek be. PIBF kötés hatására a membrán fluiditása megnő a PIBF-kezelt, nem oxidált sejtekhez képest, és a lipid raftok clusteresedése nem következik be.

A PIBF receptor-kötését confocalis mikroszkóppal vizsgáltuk. Az oxidatív stressznek kitett lymphocytákat fluorescensen jelzett PIBF-el inkubáltuk. Az oxidatív stressz hatására a H₂O₂ koncentrációjával arányosan csökkent a PIBF receptorhoz való kötődése. A PIBF kötődést jelző fluoreszcencia intenzitás a fluid fázisban 20% -al, a

non-raft fázisban 30%-al lipid raft fázisban 40%-al míg a gél fázisban 50% -al csökkent.

Az eredmények azt mutatják, hogy az oxidatív stressz hatására a membrán lipid organizációban kialakuló változások megakadályozzák a PIBF receptor aktiválódását és így a PIBF biológiai hatásának érvényesülését.

Az eredményeket egy jelenleg közlésre benyújtott cikkben foglaltuk össze.

A PIBF Receptor izolálása

Antigén előállítása: A PIBFR specifikus antitest előállításához antigénként MEC-1 B-CLL sejtvonalból izolált PIBF ligand-receptor komplexeket használtunk fel. Ennek során a PIBF ligandot affinitás-cross linking technikával (BS3 crosslinker) irreverzibilisen a PIBF receptorhoz kötöttük, majd a sejteket Triton-x tartalmú pufferben lizáltuk, majd ultracentrifugával sucrose gradiens segítségével lipid-raft frakciókat izoláltunk. 28 preparálásból összesen 504 frakciót gyűjtöttünk. A frakciókat 7,5% SDS-PAGE-en megfuttattuk, majd a receptor-ligand komplexet is tartalmazó frakciókat ligand-specifikus antitest (anti-PIBF) felhasználásával Western blot segítségével azonosítottuk. Eredményeink szerint a vizsgált minták mindössze 16,917 \pm 1,697%-a tartalmazta a PIBF-PIBFR komplexet. A pozitív frakciók poolozását követően a mintákat 7,5% PAGE-n ismételt megfuttattuk, nitrocellulóz membránra blottoltuk és a receptor-ligand komplexet tartalmazó nagy molekulatömegű csíkokat kivágtuk.

Nyulak immunizálása: Az immunizáláshoz 2 db nőstény, kb 1 éves, vadas színű nyulat használtunk fel. A preimmun vér levételét követően 12-15ug antigént tartalmazó blot-csíkot DMSO-ban feloldottunk, complet/incomplett-Freud adjuvánssal emulziót készítettünk, majd 3x1 hónapos időközzel többszörös s.c. oltás végeztünk. Az állatoktól két héttel a 2. és 3. oltást követően vért vettünk, az immunsavókat pedig ELISA teszt és Western blot segítségével vizsgáltuk. Egyik állat esetében sem sikerült értékelhető immunválaszt indukálnunk.

Az immunsavókat western blot analízissel is megvizsgáltuk, de a PIBFR-PIBF komplexet tartalmazó blot-csíkokkal egyik minta sem reagált.

Mivel eredményeink arra utalnak, hogy az oltáshoz használt 12-15 ug-nyi, nitrocellulóz-membránból kivágott antigén nem volt elegendő a megfelelő antitest-termelés kiváltásához, így tervünk az immunizálás megismétlése nagyobb

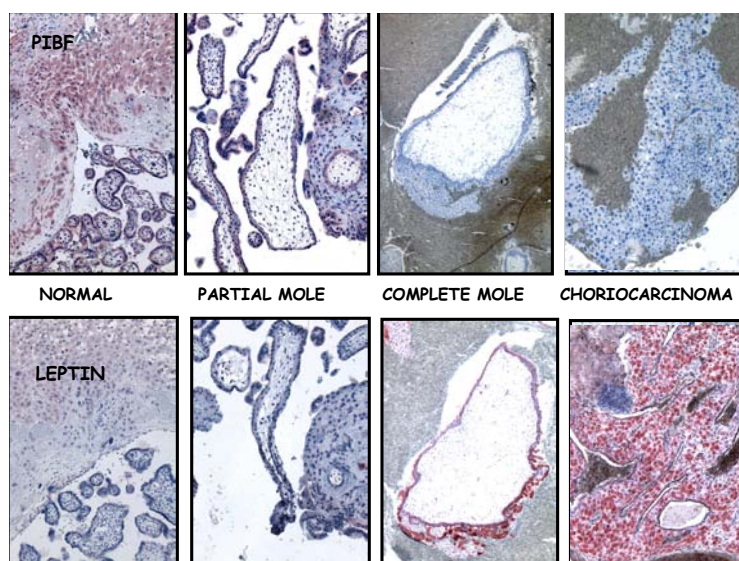
mennyiségű antigénnel (minimum 30-50 ug komplex/oltás). Jelenleg az új antigén preparátum előállításuk folyik: a mai napig 34 preparálást végeztünk el, és ebből 612 frakciót gyűjtöttünk. A frakciók feldolgozása jelenleg is folyamatban van. Mivel a PIBFR-ligand komplex preparatív mennyiségben való előállítása nagyon időigényes folyamat (kb 5-10ug komplex preparálható 1 hónap alatt), így a minimum 90ug-nyi oltóanyag (1 db nyúl 3x-i oltása) előállításához kb 9 hónapra van szükség, mely sajnos túlmutat a project tényleges zárási idején.

Mivel látható volt, hogy a munkaterv ezen részét nem fogjuk tudni időben teljesíteni,

Párhuzamosan elkezdtek a PIBF invazivitásban játszott szerepének vizsgálatát, melynek során a következő eredményeket kaptuk;

PIBF szerepe a trophoblast és tumor invázió szabályozásában.

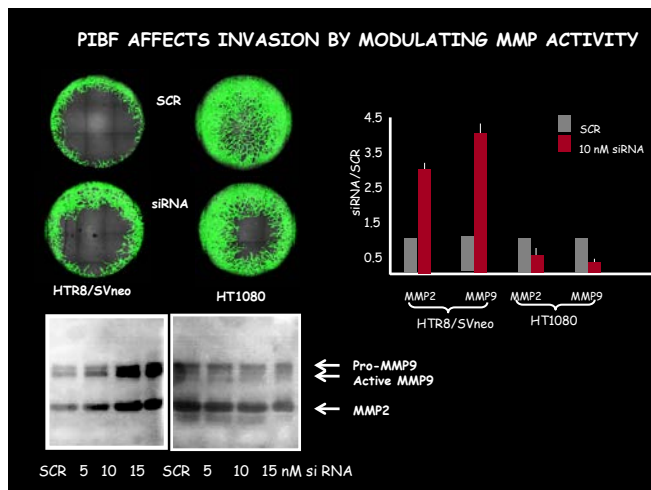
Mind a trophoblastot, mind a malignus tumorokat invazív hajlam jellemzi, míg azonban a tumor invázió látszólag nem kontrollált, a trophoblast inváziója térben és időben szigorúan behatárolt. A trophoblast invázió szabályozásának zavara terhességi pathológiák kialakulásához vezet. Korábbi adataink szerint, a terhesség az első trimeszterből származó trophoblast erősen PIBF pozitív, a fokozottan invazív mola és choriocarcinoma PIBF expressziója csökken, ill. teljesen elvész. Ellentétesen változik ezekben a szövetekben az inváziót fokozó hatású leptin és receptorának expressziója, ami felveti annak lehetőségét, hogy a PIBF gátolja egyes invazív hatású molekulák termelődését.



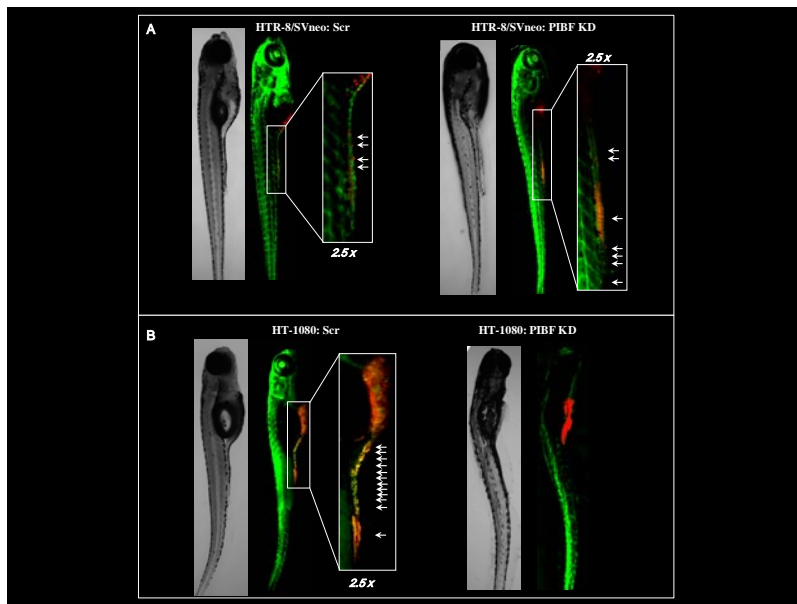
A fentiekből kiindulva összehasonlítottuk a trophoblast- és tumor invázió PIBF általi szabályozását.

A kérdés vizsgálatára SiRNS technikával PIBF deficienssé tett, ill. PIBF kezelt HTR-8/SVneo trophoblast- és HT-1080 tumor sejtvonalakat választottuk modellként. Az eredményeket további tumor sejtvonalakon és primer trophoblast sejteken ellenőriztük.

PIBF knock down trophoblast sejtek invazivitása fokozódott, míg a tumor sejtek invazivitása csökkent PIBF csendesítés hatására.



Ezeket az eredményeket *in vivo* rendszerben is megerősítettünk. A PIBF deficiens, ill. intakt trophoblast és tumor sejtvonalakat zebrahál embryókba injektáltuk, és confocalis mikroszkóppal vizsgáltuk azok invázióját. Az *in vitro* inváziós assay eredményeihez hasonlóan a PIBF gen csendesített trophoblast sejtek messzebbre vándoroltak az embryo caudalis része felé, mint a PIBF tartalmú sejtek, ezzel szemben a PIBF deficiens tumorsejtek inváziója gátolt volt, ami arra enged következtetni, hogy a PIBF fokozza a tumor invázióját.



Tekintve, hogy a matrix metalloproteinázok (MMP) és inhibitoraik (TIMP) fontos szerepet játszanak az invázióban, szubsztrát zimográfiával mértük az MMP aktivitást az inváziós assay tenyésztőfolyadékában. A PIBF csendesített trophoblast sejtek fokozott-, míg a tumorsejtek csökkent MMP2 és MMP9 aktivitást mutattak a kontrollokhöz viszonyítva. A TIMP expresszió pedig ezzel fordítottan változott. A jelenség háttérében levő folyamatok tisztázása céljából vizsgáltuk az invazivitást befolyásoló PIBF jelátviteli folyamatokat.

A PIBF receptora egy GPI-horgonyzott fehérje, amely jelátvitel céljából az IL-4 receptor alpha láncával kapcsolódik, és így, ligandkötés után STAT6-ot aktivál.

Ezért megvizsgáltuk az IL-4R α szerepét a PIBF inváziót szabályozó működésében. A PIBF mind a trophoblast, mind a tumor sejtekben STAT6 foszforilálódást indukált és az IL-4R α siRNS technikával történő csendesítése mindkét sejtvonalban megszüntette a PIBF invázióra gyakorolt hatását.

A trophoblast sejtvonalban PIBF kezelés hatására azonnali és átmeneti Akt és ERK foszforilálódást tapasztaltunk, míg a tumorsejtvonalban ezek a molekulák csak hat óra múlva, de tartósan foszforilálódtak. A tumor sejtekben ezen felül STAT3 foszforilálódást is megfigyeltünk.

A tumorban tapasztalható késői jelátvitelt a PIBF indirekt hatásának tulajdonítottuk, ezért protein array segítségével vizsgáltuk a 24 h PIBF kezelésen átesett, ill. kezetlen sejtek fehérjetermelésében tapasztalható különbségeket. A trophoblast sejtekben kevés, a tumor sejtekben azonban számos differenciáltan expresszált molekulát azonosítottunk. A PIBF tumor sejtekben - egyebek közt - EGF és HB-EGF termelést indukált, melyek közül bármelyik elindíthatja a megfigyelt

késői jelátviteli mechanizmusokat. Ennek vizsgálata céljából HB-EGF knock down sejteken vizsgáltuk a PIBF STAT3 aktiváló hatását. PIBF-kezelt HB-EGF deficiens sejtekben a STAT3 foszforilálódás csökkent, ami arra utal, hogy a PIBF-indukálta HB-EGF saját receptorán elindított jelátviteli úton aktiválja az inváziós jelátvitel központi szereplőjét, a STAT3 molekulát. Chromatin immunprecipitációval igazoltuk, hogy a PIBF képes a *HB-EGF* és az *EGF* promoter régiójához kapcsolódni, mind a trophoblast, mint a tumor sejtekben, azonban az anti-PIBF-el immunprecipitált protein-DNS complex fehérje összetétele különbözött. A trophoblast sejtekben található

50-kDa és 67-kDa PIBF izoformákon felül a tumor sejtekben a teljes hosszúságú PIBF is jelen volt, melynek nukleáris lokalizációját korábban igazoltuk.

A fentiek alapján elképzelhető, hogy a PIBF a potenciálisan invazív gének repressziója-, ill. az invazív gének indukciója révén szabályozza a trophoblast- és a tumor inváziót.

Az eredményeket egy közlésre benyújtott cikkben foglaltuk össze, amely jelenleg revízió alatt áll.